

**МИТОХОНДРИАЛЬНО-НАПРАВЛЕННЫЙ АНТИОКСИДАНТ SkQR1
ИЗБИРАТЕЛЬНО ЗАЩИЩАЕТ КЛЕТКИ, НЕ ОБЛАДАЮЩИЕ
МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ,
ОТ ДЕЙСТВИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ОБЛУЧЕНИЯ**

© Е. К. Фетисова,^{1, 2}, * М. М. Антощина,³ В. Д. Черепанинец,¹ Д. С. Изюмов,¹
И. И. Киреев,¹ Р. И. Киреев,¹ К. Г. Лямзаев,^{1, 2} Н. И. Рябченко,³
Б. В. Черняк,^{1, 2} В. П. Скулачев^{1, 2}

¹ Институт физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,

² Институт митоинженерии Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова

³ Медицинский радиологический научный центр Минздрава РФ, Обнинск;

* электронный адрес: ekfetisova@gmail.com

На примере клеток эритролейкемии человека K562 показаны радиопротекторные свойства митохондриально-направленного антиоксиданта SkQR1. Культивация с SkQR1 снижала образование двухнитевых разрывов ДНК, значительно уменьшала число хромосомных аберраций, ингибировала образование отсроченных активных форм кислорода (АФК), индуцированных гамма-облучением. Ингибируя окислительный стресс и нормализуя функции митохондрий, митохондриально-направленные антиоксиданты, по-видимому, могут служить для защиты клеток не только от непосредственных, но и от отдаленных последствий облучения, таких как нестабильность генома. SkQR1 не имел радиопротекторного свойства в отношении сублиний клеток K562, обладающей множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Неэффективность SkQR1 была обусловлена его откачкой из резистентных клеток с помощью транспортного белка Pgp 170. Это позволяет использовать SkQR1 и его аналоги для избирательной защиты от облучения нормальных тканей при радиотерапии опухолевых новообразований с высоким уровнем МЛУ.

Ключевые слова: аберрации, антиоксиданты, АФК, ДНР, радиопrotekция, митохондрии, МЛУ.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, ДНР — двухнитевые разрывы, МЛУ — множественная лекарственная устойчивость, DCF-DA — 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин-дикаетат, MnSOD — Mn-супероксиддисмутаза; SkQR1 — пластохинонилдецилродамин 19, γ-H2AX — фосфорилированная форма гистона H2AX.

В настоящее время защита от облучения является актуальной проблемой, поскольку в результате развития атомной энергетики, применения радиационных материалов в промышленности, науке и медицине расширяется круг лиц, имеющих по роду профессиональной деятельности контакт с источниками ионизирующей радиации. Кроме того, вследствие аварий на объектах атомной промышленности определенные группы населения проживают в регионах с повышенным радиоактивным фоном, связанным с радиоактивным загрязнением местности. Это обуславливает важность поисков защиты от эффектов низко- и средненейтросивного облучения и однократных радиационных воздействий в малых и средних дозах. Известно, что в основе повреждающего действия разного рода облучений лежат образование активных форм кислорода (АФК) и индукция окислительного стресса (Riley, 1994; von Sonntag, 2006). При γ-облучении воды происходит ее радиолиз, сопровождающийся генерацией первичных АФК, которые затем превращаются в пероксид водорода (Ewing, Jones, 1987). При взаимодействии АФК

с органическими молекулами образуются вторичные радикалы, которые могут приводить к гибели клетки или ее канцерогенному перерождению (Cerutti, 1985; Gobbel et al., 1998).

Долгое время ядерная ДНК считалась основным объектом радиационного повреждения. Однако, по последним данным, при облучении повреждаются и многие другие клеточные структуры, наиболее значимыми из которых являются митохондрии (Azzam et al., 2012; Kam, Banati, 2013). Наиболее ранние свидетельства определяющей роли митохондриальных АФК при радиационно-индукционном повреждении базировались на радиопротекторном эффекте гиперэкспрессии митохондриальной Mn-супероксиддисмутазы (MnSOD), играющей важную роль в антиоксидантной защите клетки (Hirose et al., 1993; Motoori et al., 2001). Стабильный нитроксильный радикал (TEMPO), адресованный в митохондрии посредством конъюгации его с грамицидином S (Jiang et al., 2008) или трифенилfosфонием (Huang et al., 2010), также обладал радиопротекторными свойствами, предотвращая

накопление АФК в митохондриях. Согласно данным из литературы, в первые минуты после облучения происходит кратковременное увеличение митохондриальных АФК (Leach et al., 2001). Спустя несколько часов в митохондриях накапливаются поздние (отсроченные) АФК. Их генерация может быть связана с повреждением мембранны митохондрий и комплексов электрон-транспортной цепи, что приводит к персистирующему окислительному стрессу (Tulard et al., 2003; Yoshida et al., 2012). При облучении во внутренней мембране митохондрий происходит избирательное окисление кардиолипина, в то время как другие фосфолипиды, более многочисленные, не подвергаются окислению (Tyurina et al., 2011). Окисление кардиолипина, катализируемое цитохромом C, способствует высвобождению из митохондрий ряда белков (Kagan et al., 2005), которые, выходя в цитозоль клетки, индуцируют апоптоз (Ogura et al., 2009; Indo et al., 2012). Защита кардиолипина от окисления с помощью митохондриально-направленных аналогов олеиновой и стеариновой кислот приводит к защите всей клетки от радиационного повреждения (Atkinson et al., 2013). Таким образом, участие митохондриальных АФК в индукции апоптоза при облучении не вызывает сомнений.

Задача настоящей работы заключалась в выяснении возможной роли митохондриальных АФК в радиационном повреждении ядерной ДНК. Нами исследовано действие митохондриально-направленного антиоксиданта пластохинонол-декил-родамина 19 (SkQR1), который содержит остаток пластохинона (антиоксидант), конъюгированного с родамином 19 (катион) посредством деканового линкера (Антоненко и др., 2008). Как было показано ранее, SkQR1 избирательно накапливается в митохондриях различных клеток и препятствует развитию апоптоза, индуцированного окислительным стрессом (Антоненко и др., 2008; Fetisova et al., 2010; Фетисова и др., 2011). В экспериментах на животных было показано защитное действие SkQR1 при ишемическом повреждении мозга и почек, а также при остром септическом пиелонефrite (Silachev et al., 2012; Plotnikov et al., 2013). В настоящей работе на клетках эритролейкемии человека K562 показано, что SkQR1 предотвращает образование двухнитевых разрывов ДНК и хромосомных aberrаций, вызванных облучением.

Ранее мы показали (Fetisova et al., 2010; Фетисова и др., 2011), что SkQR1 является субстратом транспортного белка Pgp 170, определяющего множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) многих опухолей. Настоящие эксперименты показали, что откачка SkQR1 из клеток, обладающих МЛУ, предотвращает его радиопротекторное действие. Это указывает на возможность использования SkQR1 и его аналогов для избирательной защиты от облучения нормальных тканей при радиотерапии МЛУ-положительных опухолей.

Материал и методика

Клетки. Использовали клетки эритролейкемии человека K562 (Lozzio, Lozzio, 1975) и сублинию этих клеток с повышенным уровнем МЛУ (так называемую резистентную сублинию). Клетки резистентной сублинии были получены в результате селекции исходной линии K562 с помощью доксорубицина (Калинина и др., 2006). В этих клетках по сравнению с исходной линией K562 значительно повышена экспрессия одного из основных

белков МЛУ Pgp 170. Исходная линия K562 и ее «резистентная» сублиния с повышенным уровнем МЛУ служат классической моделью при изучении МЛУ. Высокий уровень экспрессии Pgp 170 в этих клетках подтвержден нами ранее (Fetisova et al., 2010).

Клетки выращивали на среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone, США), глютамин и антибиотики стрептомицин и пенициллин (по 100 Е/мл каждого) при 37 °C и 5 % CO₂.

Получение клеток из операционного материала опухолей молочной железы человека. Образцы опухолевого материала получали в отделе патологической анатомии человека Российского онкологического научного центра им. А. Н. Блохина РАМН. Образцы опухоли промывали средой, содержащей 2 % сыворотки, измельчали в небольшом количестве раствора трипсина, продавливали через диссоциирующую сеточку (Sigma-Aldrich, США), повторно промывали средой и дважды центрифугировали (900 об/мин, 3 мин). Взвесь клеток в малом количестве среды вносили в маленькие чашки Петри, содержащие покровные стекла размером 18×18 мм. В работе использовали среду RPMI, содержащую 10 % эмбриональной сыворотки и обогащенную глюкозой, инсулином, витаминами и аминокислотами.

Культивирование в присутствии SkQR1 проводили в течение 7 сут, предшествующих облучению. Накопление SkQR1 в митохондриях клеток регистрировали по флуоресценции родамина 19, используя конфокальный микроскоп (Carl Zeiss с приставкой LSM 510). В большинстве экспериментов использовали SkQR1 в концентрации 20 нМ, которая была оптимальной для защиты от окислительного стресса (Антоненко и др., 2008; Fetisova et al., 2010).

Для анализа клеточного цикла клетки фиксировали 70%-ным ледяным этанолом, обрабатывали РНКазой, окрашивали иодистым пропидием и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра (FC 500, Beckman Coulter, США).

Облучение клеток проводили в Медицинском радиологическом научном центре, используя аппарат Луч 1 (Россия), источник γ-излучения Co⁶⁰, мощность излучения 12 сГр/мин, доза облучения 1.5 Гр.

Определение двухнитевых разрывов ДНК. Содержание фосфорилированного гистона H2AX (γ-H2AX), который является маркером двухнитевых разрывов ДНК, определяли иммуноморфологическим методом. В работе использовали мышиные моноклональные антитела к γ-H2AX (Millipore, США) и вторичные антитела, конъюгированные с красителем Oregon Green (Invitrogen, США). После облучения клетки в течение 1 ч выдерживали при 37 °C, промывали физиологическим раствором и фиксировали 2%-ным формалином, после чего в течение 1 мин обрабатывали метанолом при -20 °C, промывали физиологическим раствором и инкубировали с антителами к γ-H2AX при 4 °C в течение 15 ч. На следующий день клетки обрабатывали вторичными антителами и окрашивали ядра клеток с помощью Хёхста 33342. Съемку препаратов проводили на инвертированном флуоресцентном микроскопе Axiovert 200M, используя объектив 63× с апертурой 1.3 (Zeiss, Германия), оборудованном охлаждаемой CCD-камерой Orca II — ERG (Hamamatsu, Япония, эффективный размер пикселя 100 нм), под контролем программы AxioVision (версия 4). Образцы фотографировали с шагом фокусировки 250 нм (по

500 фотографий на точку) и проводили деконволюцию с использованием интерактивного лимитирующего алгоритма. Обработку и анализ изображений проводили при помощи программы ImageJ (Rasband W., <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Для сегментации ядер использовали проекции максимальной интенсивности флуоресценции в канале DAPI с применением алгоритма Оцу. Измерение интегральной интенсивности γ -H2AX проводилось на проекциях суммарной интенсивности флуоресценции по маске сегментированных ядер.

Подсчет хромосомных aberrаций. Через 24 ч после облучения в культуру вводили демикольцин (5 мкг/мл) на 2 ч для накопления метафазных клеток. Затем клетки центрифугировали, к осадку добавляли гипотонический раствор 0.075 М KCl на 10 мин, после чего фиксировали смесью метилового спирта и ледяной уксусной кислоты (3 : 1), раскалывали на стекла, высушивали и окрашивали по Гимза. В метафазах подсчитывали хромосомные aberrации.

Для определения АФК клетки инкубировали в культуральной среде в присутствии 5 мкМ 2',7'-дихлордигидрофлуоресцеин-диацетата (DCF-DA) 20 мин при 37 °C. Флуоресценцию оценивали при 480 нм, используя

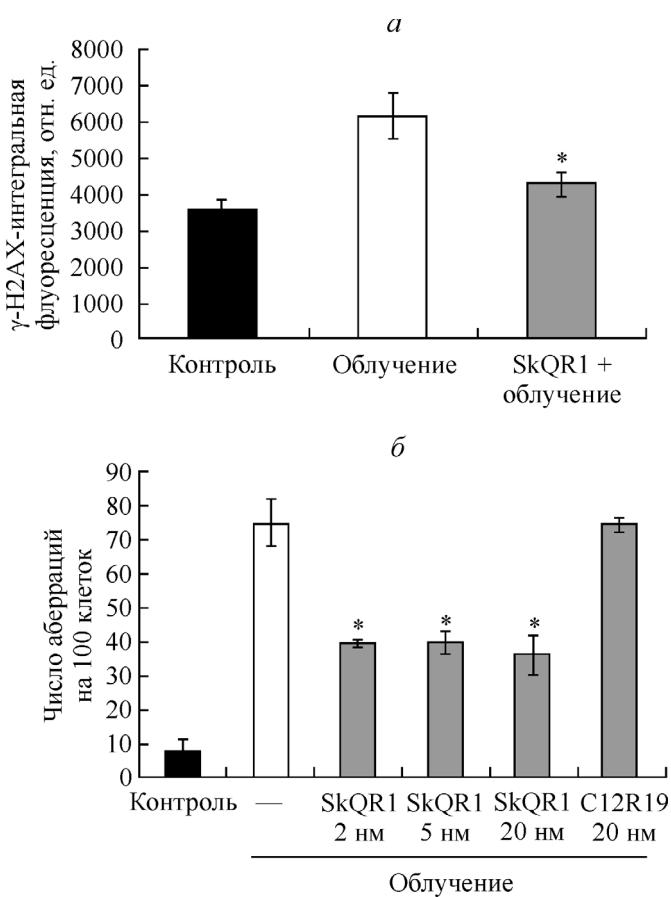


Рис. 1. Радиопротекторное действие соединения SkQR1 в клетках K562.
а — содержание фосфорилированного гистона H2AX (γ -H2AX) в клетках K562 через 1 ч после гамма-облучения; клетки культивировали в присутствии 20 нМ SkQR1 в течение 7 сут. б — число хромосомных aberrаций, индуцированных гамма-облучением, через 26 ч; клетки культивировали в присутствии SkQR1 (2, 5 или 20 нМ) или C12R19 (20 нМ) в течение 7 сут. Здесь и на рис. 3 и 5 достоверность отличия от контроля отмечена звездочкой ($P < 0.05$).

а — содержание фосфорилированного гистона H2AX (γ -H2AX) в клетках K562 через 1 ч после гамма-облучения; клетки культивировали в присутствии 20 нМ SkQR1 в течение 7 сут. б — число хромосомных aberrаций, индуцированных гамма-облучением, через 26 ч; клетки культивировали в присутствии SkQR1 (2, 5 или 20 нМ) или C12R19 (20 нМ) в течение 7 сут. Здесь и на рис. 3 и 5 достоверность отличия от контроля отмечена звездочкой ($P < 0.05$).

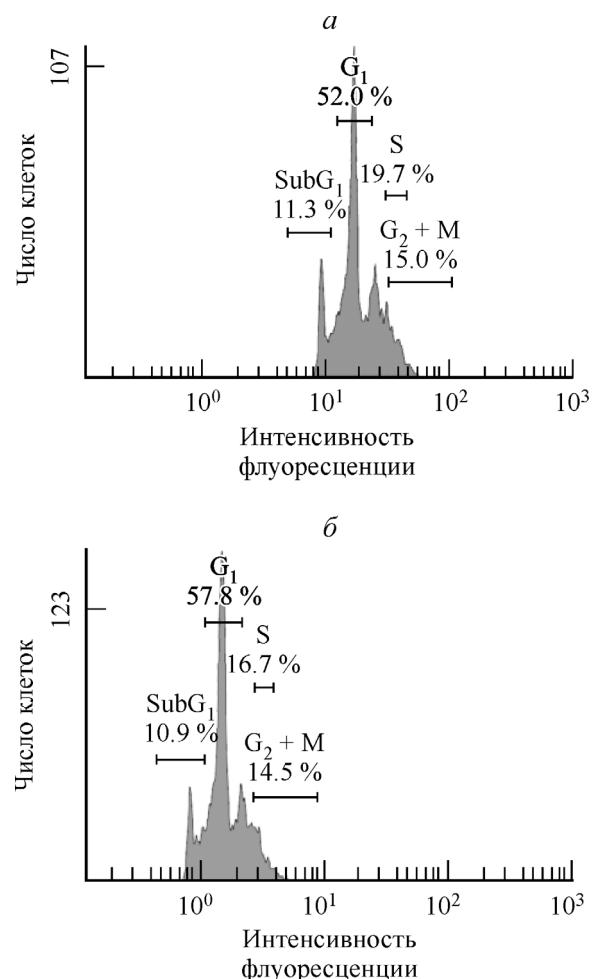


Рис. 2. Распределение клеток K562 по фазам клеточного цикла в контроле (а) и в присутствии в течение 7 сут 20 нМ SkQR1 (б).

проточный цитофлуориметр FC500 (Beckman Coulter, США).

Все эксперименты были выполнены не менее чем в трех повторностях. Результаты выражали как среднее значение и его стандартное отклонение и обрабатывали статистически с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $P < 0.05$.

Результаты

SkQR1 предотвращает образование двухнитевых разрывов ДНК, индуцированных γ -облучением. Фосфорилирование гистона H2AX сопутствует двухнитевым разрывам ДНК (ДНР), что обусловлено его участием в reparации поврежденной ДНК путем концентрации и стабилизации reparационных белков в участках разрыва (Cucinotta et al., 2008). Накопление фосфорилированного гистона H2AX (γ -H2AX) в ядрах облученных клеток тестировали с помощью специфических антител. Суммарная флуоресценция (integrated intensity), отражающая содержание фосфорилированного гистона, возрастила через 1 ч после облучения. В клетках, культивированных до облучения в присутствии SkQR1, количество γ -H2AX практически соответствовало контролльному уровню. Полученные данные приведены на

рис. 1, а и представлены как отношение уровня γ -H2AX, индуцированного облучением (в присутствии и в отсутствие SkQR1), к его содержанию в контроле (без облучения).

SkQR1 снижает число хромосомных aberrаций, индуцированных γ -облучением. Известно, что большая часть ДНР репарируется со временем. Нерепарированные ДНР в большинстве случаев приводят к образованию хромосомных aberrаций (Iliakis et al., 2004). В отличие от нормальных клеток клетки линии K562, как и большинство трансформированных клеток, обладают непостоянным кариотипом. Количество хромосом в них колеблется в значительных пределах. Ввиду непостоянства генома изучаемых клеток при подсчете aberrаций мы ограничились учетом хроматидных фрагментов, симметричных и асимметричных транслокаций. Облучение клеток K562 приводило к значительному увеличению числа хромосомных aberrаций. В одной клетке могло возникать одновременно несколько aberrаций, благодаря чему общее число aberrаций превосходило число клеток с aberrациями. Культивирование клеток с

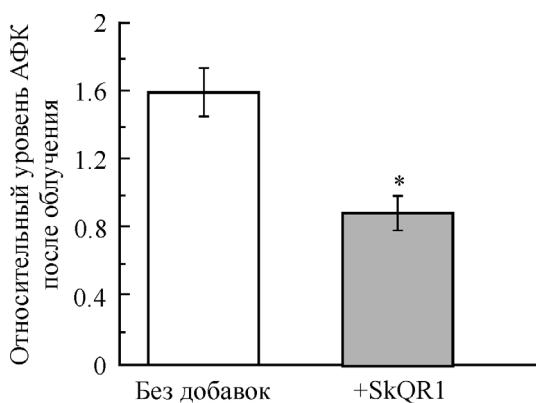


Рис. 3. Влияние SkQR1 на образование АФК в клетках K562 после гамма-облучения.

Клетки культивировали с 20 нМ SkQR1 в течение 7 сут. Об образовании АФК судили по флуоресценции зонда DCF-DA через 32 ч после гамма-облучения. Данные представлены как отношение уровня АФК в облученных клетках к контрольному.

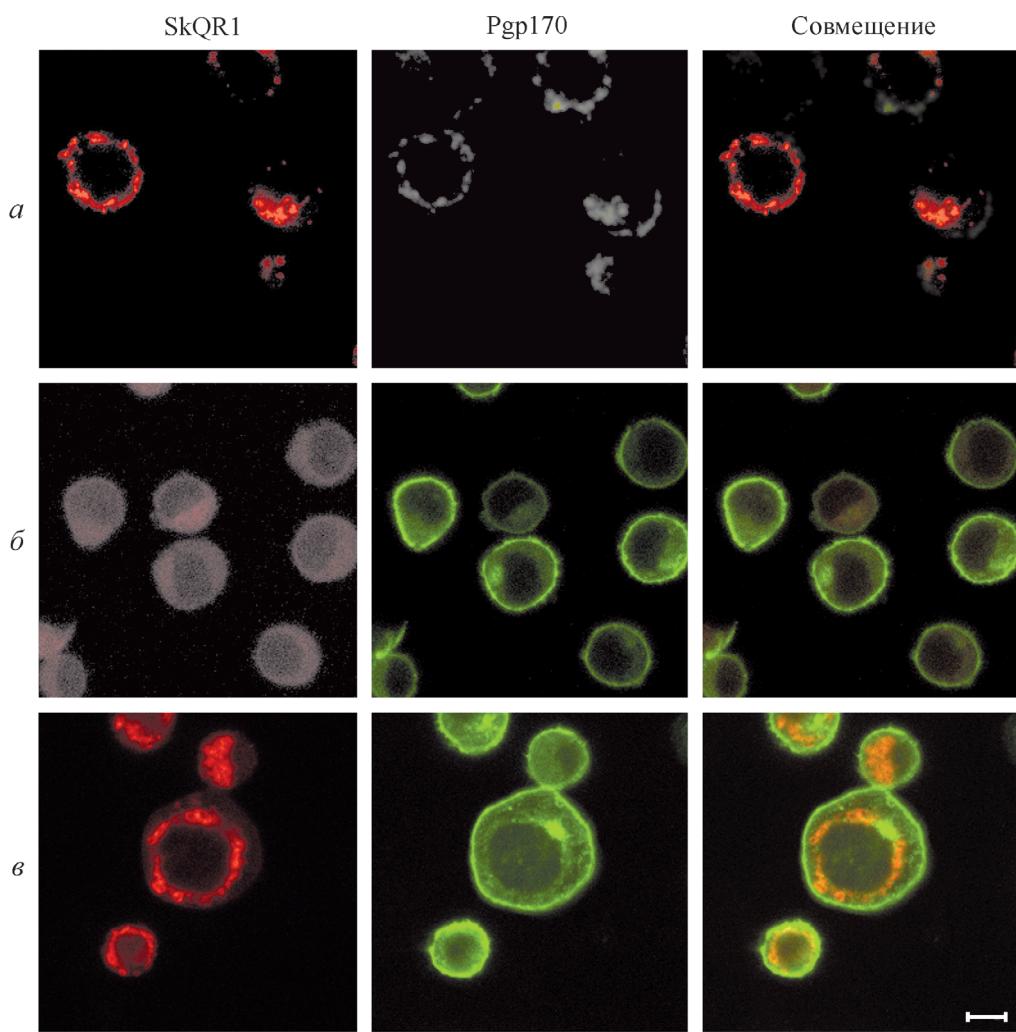


Рис. 4. Накопление SkQR1 в различных сублиниях клеток K562, меченных антителами к Р-гликопротеину Pgp 170.

а — исходная сублиния клеток K562; б — сублиния клеток K562 с повышенным уровнем МЛУ и высоким содержанием Pgp 170; в — сублиния клеток K562 с повышенным уровнем МЛУ в присутствии 5 мкМ плuronика L61 (ингибитора Pgp 170). В культуральную среду добавляли 50 нМ SkQR1 на 2 ч, затем обрабатывали антителами к Pgp 170. Красная флуоресценция — SkQR1, зеленая — Pgp 170. Масштабный отрезок — 2.5 мкм.

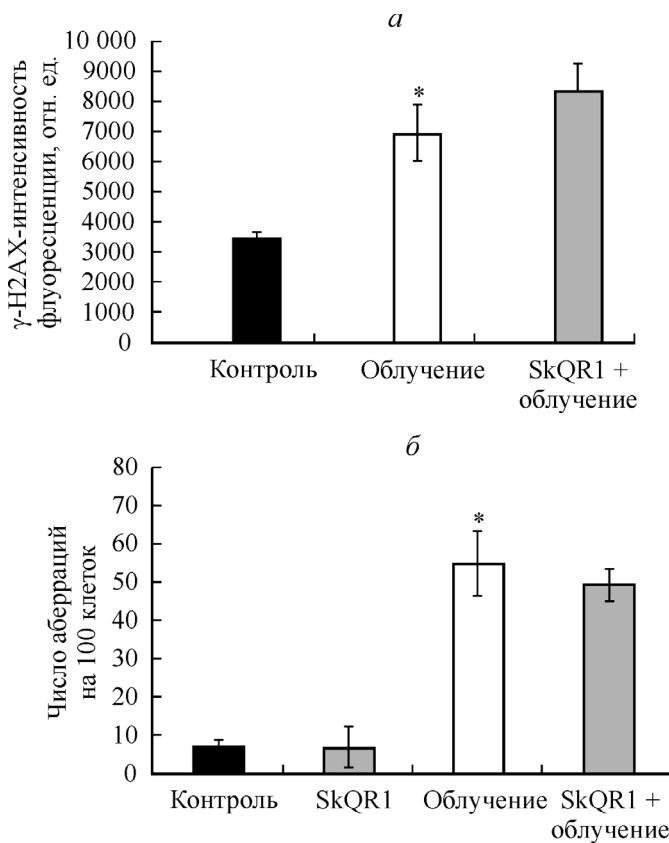


Рис. 5. Влияние SkQR1 (20 нМ, 7 сут) на накопление фосфорилированного гистона H2AX (*а*) и число хромосомных аберраций (*б*) после гамма-облучения сублиний клеток K562 с высоким содержанием Pgp 170.

а, б — через 1 и 26 ч после облучения соответственно.

SkQR1 в концентрации 20 нМ, предшествующее облучению, значительно снижало количество хромосомных аберраций (рис. 1, *б*). Аналогичные данные были получены для концентраций SkQR1 ниже 20 нМ (до 2 нМ). В качестве соединения, контрольного к SkQR1, использовали соединение C12R19, состоящее из родамина и линкера (C12) и не содержащее хинона, являющегося антиоксидантной составляющей SkQR1. Это соединение не предотвращало накопления аберраций, что подтвердило антиоксидантную природу защитного действия SkQR1.

SkQR1 не влияет на прохождение клетками K562 фаз клеточного цикла. Известно, что различные фазы клеточного цикла различаются по чувствительности к облучению (Terasima, Tolmach, 1963). Нами проведен сравнительный анализ распределения клеток по фазам цикла при культивировании в течение 7 сут в присутствии SkQR1 и в контроле. На рис. 2 можно видеть, что SkQR1 не влиял на распределение клеток по фазам цикла. Таким образом, независимо от присутствия SkQR1 облучению подвергались клетки, находящиеся в одних тех же фазах цикла.

SkQR1 подавляет генерацию отсроченных АФК, индуцированных гамма-облучением. В клетках K562 содержание внутриклеточных АФК увеличивается через 32 ч после гамма-облучения. Присутствие SkQR1 приводило к снижению уровня отсроченных АФК, что указывает на их митохондриальное происхождение (рис. 3). Следует отметить, что культивирование клеток с SkQR1 не вызывало заметных измене-

ний уровня АФК в необлученных клетках. Недавно опубликованы сходные данные, полученные на клетках K562 (образование АФК через 24 ч после X-облучения) (Saenko et al., 2013). Авторы показали, что ротенон (ингибитор митохондриальной NADH-оксидазы) частично блокирует образование поздних АФК, что хорошо согласуется с нашими данными, указывающими на их митохондриальную природу.

SkQR1 не обладает радиопротекторным действием в сублинии клеток K562 с высоким уровнем МЛУ. Как нами было показано ранее (Fetisova et al., 2010; Фетисова и др., 2011), SkQR1 является субстратом системы, обеспечивающей МЛУ, и откачивается из клеток с помощью Р-гликопротеина (Pgp 170). Откачка SkQR1 наглядно проиллюстрирована в резистентной сублини K562 с высоким содержанием Pgp 170. Окрашивание клеток антителами к Pgp 170 (зеленая флуоресценция), в сочетании с детекцией родаминовой флуоресценции SkQR1 (красная) показало накопление SkQR1 в клетках с низким содержанием Pgp 170 (рис. 4, *а*) и практически полное отсутствие SkQR1 в клетках с высоким уровнем этого белка (рис. 4, *б*). Для подтверждения роли Pgp 170 в откачке SkQR1 использовали его ингибитор — плуроник L61 (Kabanov et al., 2002; Melic-Nubarov, Kyrova, 2005). Встраиваясь в клеточную мембрану, плуроник L61 ингибирует активность Pgp 170, что приводит к накоплению SkQR1 в клетках резистентной сублини (рис. 4, *в*). Эффективная откачка SkQR1 из клеток резистентной сублини приводит к тому, что его радиопротекторное действие в этих клетках не проявляется. Как и в случае исходной сублини K562, гамма-облучение резистентной сублини приводило к повышению уровня γ -H2AX и значительному накоплению хромосомных аберраций, но присутствие SkQR1 не влияло на повреждение ДНК (рис. 5, *а, б*).

Накопление SkQR1 в клетках рака молочной железы человека, полученных из операционных образцов. Высокий уровень МЛУ часто наблюдается в клетках различных опухолей. На примере клеток из операционного материала рака молочной железы человека в ряде случаев удалось выявить присутствие большого количества белка Pgp 170. Наличие белка Pgp 170 коррелировало с отсутствием или снижением способности клеток опухолей накапливать SkQR1 (рис. 6).

Обсуждение

Для выяснения возможной роли митохондриальных АФК в радиационном повреждении ядерной ДНК мы исследовали влияние митохондриально-направленного антиоксиданта SkQR1 на образование ДНР и хромосомных аберраций. Известно, что в течение первых минут после облучения происходит генерация первичных АФК, обусловленных радиолизом воды, которые затем быстро исчезают (Yoshida et al., 2012). Генерация АФК в течение 30–60 мин после облучения подтверждается данными литературы (Leach et al., 2001; Saenko et al., 2013), но их источник ранее не был определен. Образование ДНР мы тестировали через 1 ч после облучения, и защитное действие SkQR1 указывало на то, что индуктором ДНР являлись АФК, имеющие митохондриальное происхождение (рис. 1, *а*). Этот вывод подтверждается данными о том, что образование ДНР снижается при гиперэкспрессии

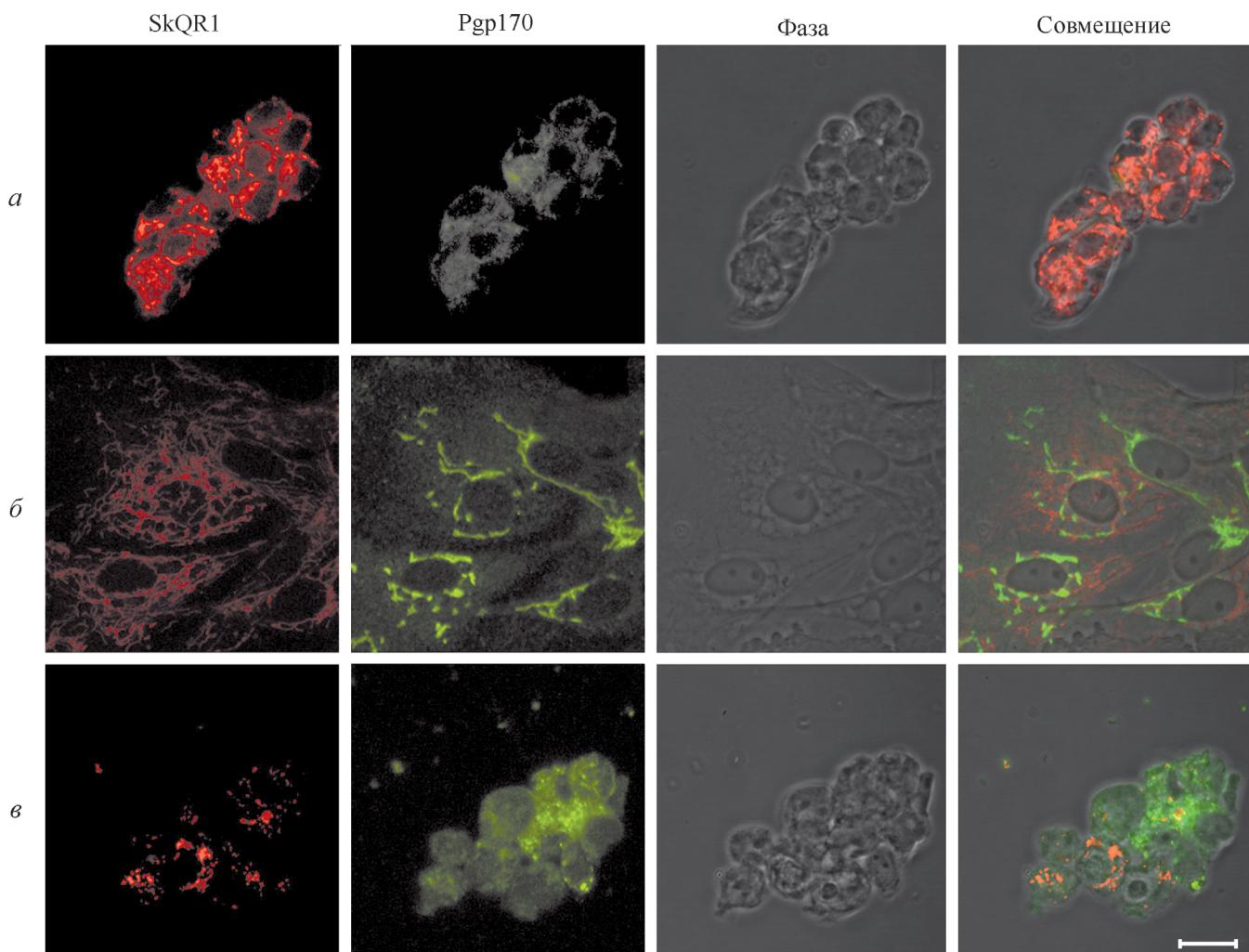


Рис. 6. Накопление SkQR1 (50 нМ, 2 ч) в клетках рака молочной железы человека, полученных из разных операционных образцов (*a—c*) и меченых антителами к Pgp 170.

а — клетки с низким содержанием Pgp 170; *б* — клетки с высоким содержанием Pgp 170; *в* — соседствуют клетки с высоким и низким содержанием Pgp 170. Красная флуоресценция — SkQR1, зеленая — Pgp 170. Культивирование: см. раздел «Материал и методика». Масштабный отрезок — 2.5 мкм.

MnSOD (Hosoki et al., 2012). По данным других авторов, экспрессия MnSOD предотвращала ДНР лишь в том случае, если рекомбинантная MnSOD была адресована в митохондрии (Indo et al., 2012).

Культивирование с SkQR1 приводило к снижению числа хромосомных aberrаций, индуцированных гамма-облучением в клетках K562 (рис. 1, *б*), что свидетельствует о ведущей роли митохондриальных АФК в развитии генетической нестабильности клеток после облучения. Известно, что генетически нестабильные клетки отличаются пониженным мембранным потенциалом митохондрий и повышенным уровнем митохондриальных АФК (Dahle et al., 2004), что может быть обусловлено как неправильной сборкой комплексов дыхательной цепи (Dayal et al., 2009), так и пониженной активностью MnSOD (Kim et al., 2006a, 2006b). Показано возникновение нестабильности генома при хроническом воздействии пероксида водорода (Limoli et al., 2003). Предполагается, что причиной возникновения генетической нестабильности при облучении может служить персистирующий окислительный стресс (Yoshida et al., 2012). SkQR1 предотвращал генерацию АФК, наблюдавшуюся

через 32 ч после облучения (рис. 3). Ранее мы наблюдали подавление с помощью митохондриально-направленных антиоксидантов образования АФК, индуцированных различными прооксидантами (Антоненко и др., 2008; Fetisova et al., 2010). Можно предполагать, что нарушения функционирования митохондрий под действием АФК, возникающих при облучении, могли инициировать продукцию отсроченных АФК, возникающих значительное время спустя после облучения. Согласно нашим данным, SkQR1 блокировал формирование ДНР уже через 1 ч после облучения, и это указывало на раннее образование митохондриальных АФК. Возможно, ингибируя ранние АФК, SkQR1 блокирует индукцию ими последующей генерации АФК (отсроченных) и образование хромосомных aberrаций. Этот вывод согласуется с данными о том, что генная терапия с помощью вектора, кодирующего MnSOD, препятствует развитию нестабильности генома в облученных клетках (Niu et al., 2010). Полученные нами результаты позволяют предполагать, что митохондриально-направленные антиоксиданты могут быть использованы для борьбы с отдаленными последствиями облучения, такими как нестабильность генома.

Радиотерапия является одним из основных методов терапии многих опухолей, и в частности тех из них, которые нечувствительны к химиотерапии благодаря МЛУ. Нормальные ткани, находящиеся в непосредственной близости от опухоли, также подвергаются облучению, что может приводить к негативным последствиям. Ранее мы показали (Fetisova et al., 2010; Фетисова и др., 2011), что SkQR1 является субстратом транспортного белка Pgp 170, определяющего МЛУ во многих опухолях. Этот вывод подтвердили эксперименты с различными сублинами клеток K562 (рис. 5) и с клетками операционных образцов рака молочной железы человека (рис. 6). Селективно накапливаясь в нормальных клетках (не имеющих, как правило, МЛУ), SkQR1 способен избирательно защищать их от поражающего действия облучения. В то же время опухолевые клетки, обладающие высоким уровнем МЛУ, эффективно откачивают SkQR1, так что он не препятствует радиотерапии этих опухолей.

Таким образом, в настоящей работе на примере клеток эритролейкемии человека K562 показаны радиопротекторные свойства митохондриально-направленного антиоксиданта SkQR1. Присутствие SkQR1 в среде культивирования уменьшало повреждение ДНК (ДНР), уменьшало число хромосомных аберраций, ингибировало образование отсроченных АФК, индуцированных гамма-облучением. Подавляя окислительный стресс и нормализуя функции митохондрий, митохондриально-направленные антиоксиданты могут служить для защиты клеток как от немедленного повреждения ДНК, так и от отдаленных последствий облучения, таких как нестабильность генома. Селективная откачка SkQR1 из клеток, обладающих высоким уровнем МЛУ, открывает перспективы его использования для защиты от облучения нормальных тканей во время радиотерапии опухолевых новообразований, обладающих МЛУ.

Авторы выражают благодарность зав. отделом Патологоанатомического отделения опухолей РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАН А. И. Карседадзе и сотруднику отдела С. Т. Кадыровой за предоставление операционного материала опухолей, а также старшему научному сотруднику Научно-исследовательского института экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАН Л. Ф. Морозовой за консультацию по культивированию клеток операционного материала из опухолей человека.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-01563-а и 13-04-40309-н) и Российского научного фонда (проект 14-24-00107).

Список литературы

Антоненко Ю. Н., Аветисян А. В., Бакеева Л. Е., Черняк Б. В., Чертков В. А., Домниня Л. В., Иванова О. Ю., Изюмов Д. С., Хайлова Л. С., Клишин С. С., Коршунова Г. А., Лямзин К. Г., Мунтян М. С., Непряхина О. К., Пашковская А. А., Плетюшкина О. Ю., Пустовидко А. В., Рогинский В. А., Рокитская Т. И., Рууге Э. К., Сапронова В. Б., Северина И. И., Симонян Р. А., Скулачев И. В., Скулачев М. В., Сумбатян Н. В., Свиряева И. В., Ташлицкий В. Н., Васильев Ю. М., Высоких М. Ю., Ягужинский Л. С., Замятнин А. А., Скулачев В. П. 2008. Производное пластихиона, адресованное в митохондрии, как средство, прерывающее программу старения. Катионные производ-

ные пластихиона: синтез и исследование *in vitro*. Биохимия. 73 (12) : 1589—1606 (Antonenko Y., Avetisyan A., Bakeeva L., Chernyak B., Chertkov V., Domnina L., Ivanova O., Izumov D., Khailova L., Klishin S., Korshunova G., Lyamzaev K., Muntyan M., Nepryakhina O., Pashkovskaya A., Pletjushkina O., Pustovidko A., Roginsky V., Rokitskaya T., Ruuge E., Saprunova V., Severina I., Simonyan R., Skulachev I., Skulachev M., Sumbatyan N., Sviryaeva I., Tashlitsky V., Vassiliev J., Vyssokikh M., Yaguzhinsky L., Zamyatin A., Skulachev V. 2008. Mitochondria-targeted plastoquinone derivatives as tools to interrupt execution of an aging program. 1. Cationic plastoquinone derivatives: synthesis and *in vitro* studies. Biochemistry (Moscow). 73 (12) : 1273—1287.

Калинина Е. В., Чернов Н. Н., Саприн А. Н., Котова Я. Н., Андреев Я. А., Соломка В. С., Шербак Н. П. 2006. Изменение экспрессии генов антиоксидантных ферментов, гемоксигеназы-1, Bcl-2, Bcl-xL и уровня активных форм кислорода при формировании резистентности опухолевых клеток к доксорубицину. Биохимия. 71 (11) : 1479—1487. (Kalinina E. V., Chernov N. N., Saprin A. N., Kotova Y. N., Andreev Y. A., Solomka V. S., Scherbak N. P. 2006. Changes in expression of genes encoding antioxidant enzymes, heme oxygenase-1, Bcl-2, and Bcl-xL and in level of reactive oxygen species in tumor cells resistant to doxorubicin. Biochemistry (Moscow). 71 (11) : 1200—1206.)

Фетисова Е. К., Аветисян А. В., Изюмов Д. С., Коротецкая М. В., Ташлицкий В. Н., Скулачев В. П., Черняк Б. В. 2011. Р-гликопротеин, обуславливающий множественную лекарственную устойчивость, препятствует проявлению антиапоптотического действия митохондриально-направленного антиоксиданта SkQR1. Цитология. 53 (6) : 488—497. (Fetisova E. K., Avetisyan A. V., Izumov D. S., Korotetskaya M. V., Tashlitskii V. N., Skulachev V. P., Chernyak B. V. 2011. Multidrug resistance P-glycoprotein inhibits antiapoptotic action of mitochondria-targeted antioxidant SkQR1. Cell Tissue Biol. (Tsitolgiya). 5 (1) : 37—46.)

Atkinson J., Kapralov A., Yanamala N., Tyurina Y., Amosatto A., Pearce L., Peterson J., Zhentai H., Jiang J., Samhan-Arias A., Maeda A., Fenga W., Wasserloos K., Belikova N., Tyurin V., Wang H., Fletcher J., Wang Y., Vlasova I., Klein-Seetharaman J., Stoyanovska D., Bayira H., Pitt B., Epperly M., Greenberger J., Kagan V. 2013. A mitochondria-targeted inhibitor of cytochrome c peroxidase mitigates radiation induced death. Nat. Commun. 2 : 497—519.

Azzam E., Jay-Gerin J., Pain D. 2012. Ionizing radiation-induced metabolic oxidative stress and prolonged cell injury. Cancer Lett. 327 : 48—60.

Cerutti B. A. 1985. Prooxidant states and tumor promotion. Science. 227 : 375—380.

Cucinotta F. A., Pluth J. M., Anderson J. A., Harper J. V., O'Neil P. 2008. Biochemical kinetics model of DSB repair and induction of gamma-H2AX foci by non-homologous end-joining. Radiat. Res. 169 : 214—222.

Dahle J., Kvam E. 2004. Increased level of oxidative stress in genetically unstable cell clones. J. Photochem. Photobiol. 74 : 23—28.

Dayal D., Martin S., Owens K., Aykin-Burns N., Zhu Y., Bonnathan A., Pain D., Limoli C., Goswami P., Domann F., Spitz D. 2009. Mitochondrial complex II dysfunction can contribute significantly to genomic instability after exposure to ionizing radiation. Radiat. Res. 172 : 737—745.

Ewing D., Jones S. R. 1987. Superoxide removal and radiation protection in bacteria. Arch. Biochem. Biophys. 254 : 53—62.

Fetisova E. A., Avetisyan A. V., Izumov D. S., Korotetskaya M. V., Chernyak B. V., Skulachev V. P. 2010. Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 selectively protects MDR (Pgp 170)-negative cells against oxidative stress. FEBS Lett. 584 : 562—566.

Gobbel G. T., Bellinzona M., Vogt A. R., Gubta N. 1998. Response of post mitotic neurons to x-irradiation: implications for the role of DNA damage in neuronal apoptosis. J. Neurosci. 18 : 147—155.

Hirose K., Longo D., Oppenheim J., Matsushima K. 1993. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase

- promotes the survival of tumor cells exposed to interleukin-1, tumor necrosis factor, selected anticancer drugs, and ionizing radiation. *FASEB J.* 7 : 361—368.
- Hosoki A., Yonekura S., Zhao Q., Wei Z., Takasaki I., Tabuchi Y., Wang L., Hasuike S., Nomura T., Tachibana A., Hashiguchi K., Yonei S., Kondo T., Zhang-Akiyama Q.* 2012. Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells. *J. Radiat. Res.* 53 : 58—71.
- Huang Z., Jiang J., Belikova N., Stoyanovsky D., Kagan V., Mintz A.* 2010. Protection of normal brain cells from c-irradiation-induced apoptosis by a mitochondria-targeted triphenyl-phosphoniumnitroxide: a possible utility in glioblastoma therapy. *J. Neurooncol.* 100 : 1—8.
- Iliakis G., Wang H., Perrault A. R., Boecker W., Rosidi S., Windhofer F., Wu W., Guan J., Terzoudi G., Pantelias G.* 2004. Mechanisms of DNA double strand breaks and chromosome aberration formation. *Cytogenet. Genome Res.* 104 : 14—20.
- Indo H. P., Inanami O., Koumura T., Suenaga S., Yen H. C., Kakinuma S., Matsumoto K., Nakanishi I., St Clair W., St Clair D. K., Matsui H., Cornette R., Gusev O., Okuda T., Nakagawa Y., Ozawa T., Majima H. J.* 2012. Roles of mitochondria-generated reactive oxygen species on X-ray-induced apoptosis in a human hepatocellular carcinoma cell line, HLE. *Free Rad. Res.* 46 : 1029—1043.
- Jiang J., Belikova N., Hoye A., Zhao Q., Epperly M., Greenberger J., Wipf P., Kagan V.* 2008. A mitochondrial-targeted nitroxide/hemigramicidine S conjugate protects mouse embryonic cells against gamma irradiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 70 : 816—825.
- Kabanov A. V., Batarakova E. V., Alakhov V. V.* 2002. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54 : 759—779.
- Kagan V. E., Tyurin V. A., Jiang J., Tyurina Y. Y., Ritov V. B., Amoscato A. A., Osipov A. N., Belikova N. A., Kapralov A. A., Kini V., Vlasova I. I., Zhao Q., Zou M., Di P., Svistunenko D. A., Kurnikov I. V., Borisenko G. G.* 2005. Cytochrome c acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat. Chem. Biol.* 1 : 223—232.
- Kam Winnie Wai-Ying, Banati Richard B.* 2013. The effects of ionizing radiation on mitochondria. *Free Rad. Biol. Med.* 65 : 607—619.
- Kim G., Chandrasekaran K., Morga M.* 2006a. Mitochondrial dysfunction persistently elevated levels of reactive oxygen species and radiation-induced genomic instability: a review. *Mutagenesis* 21 : 361—367.
- Kim G., Fiskum G., Morgan W.* 2006b. A role for mitochondrial dysfunction in perpetuating radiation-induced genomic instability. *Cancer Res.* 66 : 10 377—10 383.
- Leach J., Van Tuyle G., Lin P., Schmidt-Ullrich R., Mikkelsen R.* 2001. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Res.* 61 : 3894—3901.
- Limoli C., Giedzinski E., Morgan W., Swarts S., Jones G., Hyun W.* 2003. Persistent oxidative stress in chromosomally unstable cells. *Cancer Res.* 63 : 3107—3111.
- Lozzio C. B., Lozzio B. B.* 1975. Human chronic myelogenous leukemia cell — line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* 45 : 321—334.
- Melik-Nubarov N. S., Krylova O. O.* 2005. The control of membrane properties by synthetic polymers. *Adv. Planar Bilayers Liposomes.* 2 : 121—166.
- Motoori J., Majima H., Ebara M., Kato H., Hirai F., Kakinuma S., Yamaguchi C., Ozawa T., Nagano T., Tsujii H., Saisho H.* 2001. Overexpression of mitochondrial manganese superoxide dismutase protects against radiation-induced cell death in the human hepatocellular carcinoma cell line HLE. *Cancer Res.* 61 : 5382—5388.
- Niu Y., Wang H., Wiktor-Brown D., Rugo R., Shen H., Huq M., Engelward B., Epperly M., Greenberger J.* 2010. Irradiated esophageal cells are protected from radiation-induced recombination by MnSOD gene therapy. *Radiat. Res.* 173 : 453—461.
- Ogura A., Oowada S., Kon Y., Hirayama A., Yasui H., Meike S., Kobayashi S., Kuwabara M., Inanami O.* 2009. Redox regulation in radiation-induced cytochrome c release from mitochondria of human lung carcinoma A549 cells. *Cancer Lett.* 277 : 64—71.
- Plotnikov E. Y., Morosanova M. A., Pevzner I. B., Zorova L. D., Manskikh V. N., Pulkova N. V., Galkina S. I., Skulachev V. P., Zorov D. B.* 2013. Protective effect of mitochondria-targeted antioxidants in an acute bacterial infection. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 110 : E3100—E3108.
- Riley P. A.* 1994. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Biol.* 65 : 27—33.
- Saenko Y., Cieslar-Pobuda A., Skonieczna M., Rzeszowska-Wolny J.* 2013. Changes of reactive oxygen and nitrogen species and mitochondrial functioning in human K562 and HL60 cells exposed to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 180 : 360—366.
- Silachev D. N., Isaev N. K., Pevzner I. B., Zorova L. D., Stelmashook E. V., Novikova S. V., Plotnikov E. Y., Skulachev V. P., Zorov D. B.* 2012. The mitochondria-targeted antioxidants and remote kidney preconditioning ameliorate brain damage through kidney-to-brain cross-talk. *PLoS ONE.* 7 : e51553.
- Sonntag C., von* 2006. Free radical-induced DNA damage and its repair: a chemical perspective. Berlin: Springer Verlag. 523 p.
- Terasima T., Tolmach L.* 1963. X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populations of HeLa cells. *Science.* 140 : 490—492.
- Tulard A., Hoffschir F., de Boisferon F., Luccioni C., Bradford A.* 2003. Persistent oxidative stress after ionizing radiation is involved in inherited radiosensitivity. *Free Rad. Biol. Med.* 35 : 68—77.
- Tyurina Y. Y., Tyurin V. A., Kapralova V. I., Wasserloos K., Mosher M., Epperly M. W., Greenberger J. R., Pitt B. R., Kagan V. E.* 2011. Oxidative lipidomics of γ -radiation-induced lung injury: mass spectrometric characterization of cardiolipin and phosphatidylserine peroxidation. *Radiat. Res.* 175 : 610—621.
- Yoshida T., Goto S., Kawakatsu M., Urata Y., Li T.* 2012. Mitochondrial dysfunction, a probable cause of persistent oxidative stress after exposure to ionizing radiation. *Free Rad. Res.* 46 : 147—153.

Поступила 25 VII 2014

MITOCHONDRIA-TARGETED ANTIOXIDANT SkQR1 SELECTIVELY PROTECTS
MDR-NEGATIVE CELLS AGAINST IONIZING RADIATION

*E. K. Fetisova,^{1, 2}, * M. M. Antoschina,³ V. D. Cherepanynets,¹ D. S. Izumov,¹ I. I. Kireev,¹
R. I. Kireev,¹ K. G. Lyamzaev,^{1, 2} N. I. Riabchenko,³ B. V. Chernyak,^{1, 2} V. P. Skulachev^{1, 2}*

¹ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology of M. V. Lomonosov Moscow State University,

² Mitoengineering Institute of M. V. Lomonosov Moscow State University

and ³ Federal State Institution «Medical Radiological Research Center»,

Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk; * e-mail: ekfetisova@gmail.com

Radioprotection appeared to be an important problem of today due to atom energetic development and utilization of radiation material in the industry, science and medicine. It has been shown that mitochondrial targeted antioxidant SkQR1 could attenuate radiation injury of human erythroleukemia K562 cells. Pretreatment with SkQR1 before irradiation decreased DNA double strand breaks formation, diminished the number of chromosomal aberrations and suppressed delayed ROS production. Prevention of oxidative stress and normalization of mitochondrial function by mitochondria-targeted antioxidants may be a potential therapeutic strategy not only against immediate consequences of radiation, but, either against its late consequences such as genomic instability. SkQR1 did not protect against radiation-induced damage the K562 subline with high level of multidrug resistance (MDR) due to SkQR1 extrusion with Pgp 170 MDR pump. We suggest that mitochondria-targeted antioxidants might be used for selective protection of normal cells against radiation-induced damage without interference with radiotherapy of MDR-positive tumors.

Key words: antioxidants, chromosomal aberrations, double strand breaks (DSB), mitochondria, multidrug resistance (MDR), radioprotection, reactive oxygen species (ROS).